

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



525558

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Dezember 2004 (29.12.2004)

PCT

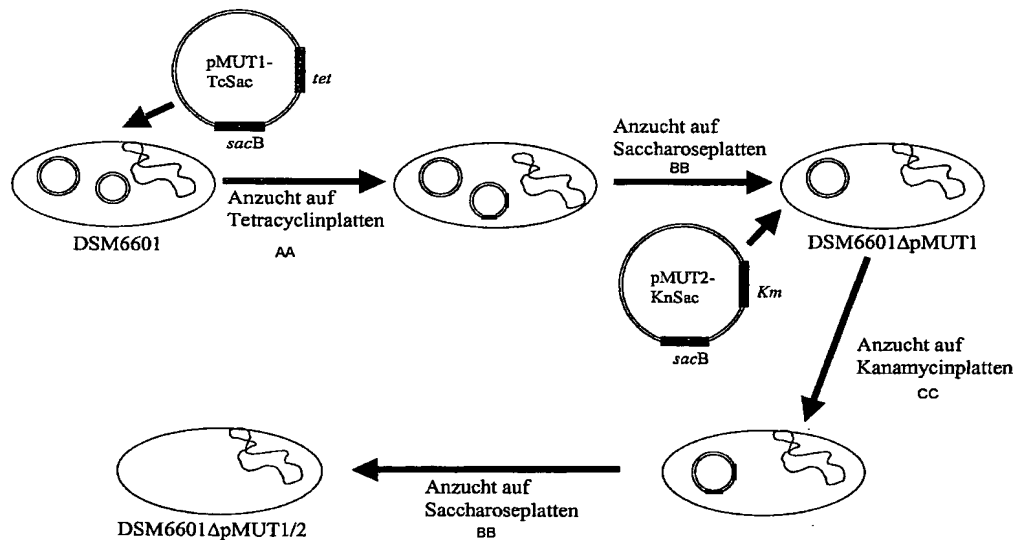
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/113575 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12R 1/19, A61K 35/74, C12N 1/20
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/006886
- (22) Internationales Anmeldedatum:
25. Juni 2004 (25.06.2004)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
103 28 669.1 26. Juni 2003 (26.06.2003) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PHARMA-ZENTRALE GMBH [DE/DE]; Loerfeldstrasse 20, 58313 Herdecke (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HACKER, Jörg [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 6, 97218 Gerbrunn (DE). OELSCHLAEGGER, Tobias [DE/DE]; Mainstrasse 68, 97318 Kitzinger (DE). OSWALD, Sibylle [DE/DE]; Burkharderstrasse 32, 97082 Würzburg (DE). SONNENBORN, Ulrich [DE/DE]; Eichenweg 6, 44799 Bochum (DE). PROPERT, Hans [DE/DE]; Rosenstrasse 102, 58095 Hagen (DE).
- (74) Anwalt: HARMSSEN, Utescher; Alter Wall 55, 20457 Hamburg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PLASMID-FREE CLONE OF E. COLI STRAIN DSM 6601

(54) Bezeichnung: PLASMIDFREIER KLON DES E. COLI-STAMMES DSM 6601



AA... CULTIVATION ON TETRACYCLINE PLATES
BB... CULTIVATION ON SUCROSE PLATES
CC... CULTIVATION ON KANAMYCIN PLATES

(57) Abstract: The invention relates to a plasmid-free clone of *Escherichia coli* strain DSM 6601, to a method for preparing the same and to the use thereof as a cloning vehicle.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen plasmidfreien Klon des *Escherichia coli*-Stammes DSM 6601, Verfahren zu dessen Herstellung sowie dessen Verwendung als Klonierungsvehikel.



MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Plasmidfreier Klon des E. coli-Stammes DSM 6601

Die Erfindung betrifft einen plasmidfreien Klon des E. coli-Stammes DSM 6601, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie die Verwendung der so erhaltenen Bakterien als Klonierungsvehikel.

E. coli, ein in der Natur, insbesondere im menschlichen und tierischen Darm vorkommendes Bakterium, ist bereits seit langem Gegenstand eingehender mikrobiologischer und gentechnologischer Untersuchungen und wird in der Gentechnik insbesondere zur Klonierung und/oder Expression bestimmter Gene bzw. Proteine eingesetzt.

Die meisten Stämme der Gattung Escherichia sind außerhalb des Darmlumens pathogen und führen im allgemeinen zu Infektionen an den befallenen Stellen. Ein apathogener Stamm der Gattung Escherichia coli ist der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegte Stamm DSM 6601, der in einigen genetischen Merkmalen von allen übrigen E. coli Stämmen abweicht. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieser Stamm nur unter erschwerten Umständen und teilweise überhaupt nicht genetisch manipulierbar ist und sich somit nicht als einfaches Klonierungsmittel einsetzen lässt.

E. coli DSM 6601 enthält natürlicherweise zwei Plasmide, die als pMut1 oder pMut2 bezeichnet werden und eine Größe von 3177 bzw. 5552 kb aufweisen. Diese Plasmide und ihre DNA-Sequenzen sind beispielsweise in der US-6,391,631 beschrieben.

Ausgehend von der Überlegung, dass die Pathogenität bzw. Apathogenität der E. coli-Bakterien offensichtlich teilweise von deren Plasmiden gesteuert wird und der weiteren Überlegung, dass die teilweise auftretende „genetische Resistenz“ der E. coli Stämme auch mit dessen kryptischen Plasmiden zusammenhängen könnte, liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, einen plasmidfreien E. coli Stamm zu entwickeln, der ansonsten hinsichtlich seiner genomischen DNA genetisch völlig identisch mit dem Originalstamm ist.

Die vorstehende Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellen eines plasmidfreien Klons des E. coli-Stammes DSM 6601, sowie durch ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Klons.

In den Figuren,

5

Fig. 1 zeigt in schematischer Form den Verfahrensweg zur Herstellung des plasmidfreien Klons des Stammes DSM 6601;

Fig. 2 zeigt die physikalische Karte des Plasmids pMut1-Tc;

10

Fig. 3 zeigt physikalische Karte des Plasmides pMut2-Kn.

Bei den langwierigen Untersuchungen, die zur vorliegenden Erfindung führten, hat sich gezeigt, dass plasmidfreie Klone des Stammes DSM 6601 mit normalen gentechnischen Methoden überhaupt nicht oder nur unter großen Schwierigkeiten herstellbar sind, so dass zur Generierung derartiger Klone besondere Wege eingeschlagen werden müssen. Da der Wildtyp des Stammes neben seiner genomischen DNA zwei Plasmide unterschiedlicher Größe aufweist, muß die Eliminierung dieser Plasmide in mehreren, zum Teil parallel laufenden Schritten erfolgen.

20

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Klone werden gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren die in dem E. coli Stamm DSM 6601 natürlich vorkommenden Plasmide pMut1 und pMut2 in einem ersten Schritt jeweils mit einer Antibiotikaresistenz markiert. Dazu werden die Plasmide gemäß herkömmlicher Verfahren isoliert und das Resistenzgen an einer gewünschten Stelle eingebracht. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das Resistenzgen zusammen mit einer Expressionskassette in das jeweilige Plasmid eingebracht, welche eine Promotor enthält, der konstitutiv oder auch induzierbar sein kann.

Die so erhaltenen Plasmide werden dann gemäß herkömmlicher Verfahren, beispielsweise dem CaCl_2 -Verfahren oder Elektroporation, in einen geeigneten Wirt eingebracht, und dort kloniert, wobei das in das jeweilige Plasmid eingebrachte Resistenzgen die Selektion der das

30

Plasmid tragenden Wirtszellen erleichtert. Ein zur Klonierung des ein Resistenzgen tragenden Plasmids geeigneter Wirt sind beispielsweise die E.coli Stämme DH5 α oder E.coli HB101.

- 5 Die das Resistenzgen tragenden Plasmide werden isoliert und anschließend wird das *sacB*-Gen in die Plasmide eingebracht, um einen weiteren Marker bereitzustellen.

Die so erhaltenen bzw. markierten Plasmide werden dann in den E.coli Stamm DSM 6601 eingebracht.

10

Nach Transformation werden die E.coli DSM 6601 auf einem Medium gezüchtet, das das Antibiotikum/die Antibiotika enthält, für das/die die Resistenzgene, die in den vorangegangenen Schritten in die Plasmide eingebracht wurde, Resistenz verleihen.

- 15 Durch Züchten auf einem derartigen Medium werden nur Klone wachsen, die gegen die im Nährmedium enthaltenen Antibiotika resistent sind. Weiterhin werden die Bakterien, da sie die ursprünglichen Plasmide pMut1 und pMut2 für ihr Wachstum nicht mehr benötigen, überflüssiges genetisches Material verlieren, so dass schlußendlich die Bakterien nur noch die modifizierten Plasmide pMut1 und pMut2 (die das/die Resistenzgene und das *sacB* Gen
20 enthalten) enthalten.

- In einem weiteren Schritt werden die so gezüchteten Bakterien in ein Nährmedium überführt, das das Wachstum von Bakterien hemmt, die das *sacB* enthalten, wobei ein Selektionsdruck ausgeübt wird, der im wesentlichen nur das Wachstum von Bakterien erlaubt, die das *sacB*-
25 Gen verloren haben. Dies kann durch Züchten des Stamms bei 30°C in Gegenwart von 10% Saccharose erfolgen, da sich bei derartigen Bedingungen nur solche Klone replizieren können, die das *sacB*-Gen tragende Plasmid verloren haben.

Als Folge wird ein plasmidfreies Derivat des Stammes DSM 6601 erhalten.

- 30 Es wurde nun gefunden, dass die erfindungsgemäßen Klone mit Maßgabe des Verlusts der Plasmide keinerlei Veränderung der genomischen DNA erfahren haben und sich

überraschenderweise gut als Klonierungsvehikel einsetzen lassen.

Damit können sie im Labor gefahrlos als Wirtszelle für die Klonierung bzw. Expression einer Vielzahl von Genen bzw. Proteinen eingesetzt werden. Versuche mit dem 5 erfindungsgemäßen Stamm DSM 6601 Δ pMut1/2 haben gezeigt, dass er ein besonders guter Akzeptor für Fremd-DNA ist, wenn diese in seine eigenen, in isolierter Form vorliegenden Plasmide integriert wird, d.h. also, die eigenen Plasmide als Klonierungsvektoren für die Fremd-DNA fungieren. Weiterhin können sie, da sie von einem apathogenen Stamm 10 abgeleitet sind zur Behandlung von Störungen des Gastrointestinaltraktes in Tieren und Menschen eingesetzt werden. Dazu können sie, wenn gewünscht, mit Fremdgenen transformiert werden, die die Adhäsion der Bakterien an die Mucosa fördern, wie beispielsweise Adhäsinen, die ggf. Wirtstier-spezifisch die Adhäsion der Bakterien an die Mucosa von beispielsweise Rindern und/oder Schweinen fördern und somit den das Wachstum anderer pathogener Mikroorganismen behindern bzw. verhindern.

15 Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezug auf die Beispiele weiter erläutert.

Beispiel 1

Veränderung von pMut 1

20 Die beiden natürlich vorkommenden Plasmide pMut1 und pMut2 des Wildtyps DSM 6601 nach dem Plasmid-Midiprep-Protokoll von QIAGEN (QIAGEN Plasmid Purification Handbook 12/2002, Seiten 16-20) isoliert.

25 Für die Markierung des Plasmids pMut1 wurde die vom Vektor pBR322 abgeleitete Tetracyclinresistenzkassette ausgewählt. Der zugehörige Promotor wurde aus dem Plasmid pASK75 entnommen. Das aus dieser Klonierung resultierende Plasmid wurde mit pKS-tetA^{tetp/o} bezeichnet. Das Insert *tetA*^{tetp/o} (Insertgröße 1,5 kb) wurde mit den Restriktions- 30 enzymen *Xba*I und *Hind*III ausgeschnitten. Das *Xba*I/*Hind*III-Fragment wurde über eine *Nde*I-Restriktionsschnittstelle in das Plasmid pMut1 eingeführt.

Dazu wurde nach Restriktionsverdau der Plasmide mit den entsprechenden Enzymen der Restriktionsansatz über eine Säule (Quiagen, PCR Purification Kit) gereinigt und einer Klenow-Behandlung unterzogen, um „blunt ends“ zu bilden. Um eine Religation des Plasmids pMut1 zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung des mit dem Restriktionsenzym *NdeI* linearisierten und mit Klenow-Enzym behandelten Plasmids durchgeführt. Anschließend wurde der Vektor pMut1 und das Insert *tetA*^{tet^r/o} ligiert und damit der *E. coli* K-12 Stamm DH5α transformiert.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 150 ml LB-Medium (Lurea-Bertani-Medium) mit 1,5 ml einer ÜN-Kultur beimpft und bei 37°C geschüttelt bis zu einer OD₆₀₀=0,5. Danach wurde die Bakterienkultur 20 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten mit 4000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde 3 x in sterilem, eiskaltem, 10%-igem Glycerin gewaschen, zuerst mit 100%, dann mit 50% und zuletzt mit 10% des Ausgangsvolumens. Zum Schluß wurde das gewaschene Pellet in 300 µl 10% Glycerin resuspendiert, aliquotiert (40 µl) und bei -80°C gelagert. Zur Transformation von Bakterienzellen wurden 1-2 µl Plasmid-DNA (1-100 ng) mit 40 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird dieser Ansatz luftblasenfrei zwischen die beiden Elektroden einer sterilen und vorgekühlten 2 mm Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wird gut abgetrocknet und in den Elektrodenhalter eingesetzt. Nach Durchführung des Elektroimpulses bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült und bei 37°C für 1-2 Std. im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgezogen. Das Sediment wurde in den verbliebenen 100 µl resuspendiert, auf einer Tc-haltigen Selektionsplatte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

Der Erfolg der Klonierung wurde durch Minipräparation des jeweiligen Plasmids einzelner Bakterienklone überprüft. Das mit der Tetracyclinkassette markierte Plasmid pMut1 wurde als pMut1-Tc bezeichnet. In Fig. 2 ist die physikalische Karte des Plasmids pMut1-Tc dargestellt. Angegeben ist die Insertionsstelle (ursprünglich eine singuläre *NdeI*-Stelle) für das DNA-Fragment, welches Tetracyclinresistenz vermittelt. Dieses DNA-Fragment enthält

auch die für Klonierungen geeignete singuläre *EcoRI*-Sequenz. Des weiteren sind die Bindungsstellen für die Primer Muta 5 und Muta 6 angegeben, die zum spezifischen Nachweis dieses Plasmids mittels PCR geeignet sind.

5 Beispiel 2

Veränderung von pMut2

Für die Markierung des Plasmides pMut2 wurde eine Kanamycinresistenzkassette ausgewählt, die von dem Vektor pACYC177 abgeleitet wurde. Dazu wurde aus diesem die
10 Resistenzkassette (Größe 1,34 kb) mit dem Restriktionsenzym *StuI* ausgeschnitten und über eine *BglII*-Restriktionsschnittstelle in das Plasmid pMut2 eingeführt. Nach Restriktionsverdau der Plasmide mit den entsprechenden Enzymen wurde der Restriktionsansatz über eine Säule (Quiagen, PCR Fraktion Kit) gereinigt und das Plasmid pMut2 einer Klenow-Behandlung unterzogen, um „blunt ends“ für die Klonierung zu bilden. Um eine Religation
15 des Plasmides pMut2 zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung des mit dem Restriktionsenzym *BglII* linearisierten und mit Klenow-Enzym behandelten Plasmides durchgeführt. Anschließend wurde der Vektor pMut2 und die Kanamycinkassette ligiert und damit der *E. coli* K-12 Stamm DH5 α , wie in Beispiel 1 beschrieben, transformiert. Die Transformation wurde auf Kn-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Der Erfolg der Klo-
20 nierung wurde durch Minipräparation von Plasmid-DNA einzelner Bakterienklone überprüft. Das mit der Kanamycinkassette markierte Plasmid pMut2 wurde als pMut2-Kn bezeichnet.

In Fig. 3 ist die physikalische Karte des Plasmides pMut2-Kn dargestellt. Die Insertionsstelle (ursprünglich eine *BglII*-Stelle) für die Kanamycinresistenzkassette sowie die singuläre und
25 als Klonierungsstelle geeignete *EcoRI*-Sequenz sind eingezeichnet. Mit Muta 7 bis Muta 10 sind jene Bereiche gekennzeichnet, die komplementär zu den Sequenzen der Primer sind, die für die spezifischen Nachweis dieses Plasmids mittels PCR geeignet sind.

Beispiel 3

30 Einbringen des *sacB*-Gens

Um das *sacB*-Gen (kodiert für eine Levansaccharase) in die mit Resistenzkassetten markierten Plasmide pMut1-Tc und pMut2-Kn einzubringen, wurde in beiden Plasmiden die jeweils singuläre *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle ausgewählt. Das *sacB*-Gen (Größe 2,6 kb) wurde aus dem Plasmid pCVD442 mit dem Restriktionsenzym *PstI* isoliert. Zur Vorbereitung der Vektoren pMut1-Tc und pMut2-Kn wurden diese Plasmide mit *EcoRI* linearisiert und anschließend zur Bildung von „blunt ends“ einer Klenow-Behandlung unterzogen sowie dephosphoryliert. Das Insert *sacB* wurde nach dem Restriktionsverdau mit *PstI* gereinigt und mit Klenow-Enzym behandelt. Die linearisierten Vektoren und das Insert wurden ligiert und damit der *E. coli* K-12 Stamm DH5 α , der wie in Beispiel 1 beschrieben kompetent gemacht wurde, transformiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Minipräparation von Plasmid-DNA einzelner Bakterienklone und anschließende Restriktionsanalyse überprüft. Die mit dem *sacB*-Gen markierten Plasmide pMut1-Tc und pMut2-Kn wurden als pMut1-TcSac und pMut2-KnSac bezeichnet.

Beispiel 4

Herstellung eines plasmidfreien Klones des *E. coli*-Stammes DSM 6601

Zunächst wurde das Plasmid pMut1-TcSac durch Elektroporation in diesen Stamm, wie in Beispiel 1 beschrieben, transformiert. Nach der Elektroporation zur Überführung des Plasmides pMut1-TcSac in den Stamm DSM 6601 wurde der Ansatz auf Tc-haltigen (50 μ g/ml) LB-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Tetracyclin-resistenten Bakterienklone wurden auf den Besitz des Plasmids pMut1-TcSac und den damit verbundenen Verlust des natürlich vorkommenden Plasmides pMut1 überprüft. Der Verlust des Plasmids pMut1 wurde nach Präparation der Plasmid DNA und Restriktionsverdau derselben mit dem Enzym *EcoRI* nach elektrophoretischer Auftrennung der linearisierten Plasmide durch das Fehlen der pMut1 repräsentierenden DNA-Bande nachgewiesen.

Anschließend wurde einer dieser Klone über Nacht in LB-Medium mit 10% Saccharose bei 30°C angezogen und dann auf LB-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert (LB-Medium besteht aus 10 g Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt und 5 g Natriumchlorid auf 1 l destilliertem

Wasser). Saccharose-haltiges LB-Medium wurde hergestellt, indem dem autoklavierten Medium nach dem Abkühlen auf 45°C von einer steril filtrierten 50 prozentigen (Gew./Vol.) Saccharosestammlösung ein Anteil bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben wird.) Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen können nur jene Klone replizieren, die *sacB* nicht mehr exprimieren, d.h. diese das *sacB*-Gen tragende Plasmid verloren haben. Der daraus resultierende Stamm DSM 6601 Δ pMut1 wurde auf den Verlust des Plasmides pMut1-TcSac überprüft.

Danach wurde durch Elektroporation das Plasmid pMut2-KnSac in den Stamm DSM 6601 Δ pMut1 eingebracht.

Nach der Elektroporation zur Überführung des Plasmides pMut2-KnSac in den Stamm DSM 6601 Δ pMut1 wurde der Ansatz auf Kn-haltigen (50 μ g/ml) LB-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Kanamycin-resistenten Bakterienklone wurden auf den Besitz des Plasmids pMut2-KnSac und den damit verbundenen Verlust des natürlich vorkommenden Plasmides pMut2 überprüft. Anschließend wurde einer dieser Klone über Nacht in LB-Medium mit 10% Saccharose bei 30°C angezogen und dann auf LB-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Der daraus resultierende Stamm DSM 6601 Δ pMut1/2 wurde auf den Verlust des Plasmides pMut2-KnSac überprüft.

Weiterhin wurde von dem plasmidfreien Stamm DSM 6601 Δ pMut1/2 eine Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt, um evtl. chromosomale Veränderungen des Stammes auszuschließen. Es wurde festgestellt, dass keine Änderungen nachweisbar waren und weitere Untersuchungen haben ergeben, dass der plasmidfreie Klon keinerlei morphologische, biochemische oder fermentative Änderungen zeigt.

Patentansprüche

1. Plasmidfreier Klon des Escherichia coli-Stammes DSM 6601.
5
2. Verfahren zur Herstellung eines plasmidfreien Klons nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - a) Einbringen eines Resistenzgens in die Plasmide pMut1 und pMut2,
 - b) Einbringen des *sacB*-Gens in die in Schritt a) erhaltenen Plasmide,
 - 10 c) Einbringen der in Schritt b) erhaltenen Plasmide in den E.coli-Stamm DSM 6601 und Züchten des Stamms unter Bedingungen, bei denen die natürlich vorkommenden Plasmide pMut1 und pMut2 durch die in Schritt b) erhaltenen Plasmide verdrängt werden; und
 - d) Züchten der in Schritt c) erhaltenen Klone unter Bedingungen, die im
15 wesentlichen nur ein Wachstum von Bakterien erlaubt, denen das *sacB*-Gen fehlt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Resistenzgene in einer
20 Expressionskassette vorliegen.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Resistenzgene ausgewählt sind unter Tetracyclinresistenz oder Kanamycinresistenz.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das
25 Plasmid pMut1 mit einer Tetracyclinresistenzkassette und dem *sacB*-Gen markiert ist und dass das ursprüngliche Plasmid pMut2 mit einer Kanamycinresistenzkassette und dem *sacB*-Gen markiert ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die mit dem Plasmid pMut1, das
30 mit einer Tetracyclinresistenzkassette und dem *sacB*-Gen markiert ist, transformierten

Bakterien auf Tetracyclin enthaltenden Platten und anschließend auf Saccharose enthaltenden Platten gezüchtet werden, und dass nach Eliminierung des Plasmids pMut1 im ersten Schritt die Eliminierung des Plasmids pMut2 durch Anzucht auf Kanamycinplatten und Weiterkultivierung auf Saccharoseplatten erfolgt.

5

7. Verwendung der plasmidfreien Klone nach Anspruch 1 als Klonierungsstämme.
8. Verwendung der plasmidfreien Klone nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von gastrointestinalen Störungen in Tieren.

10

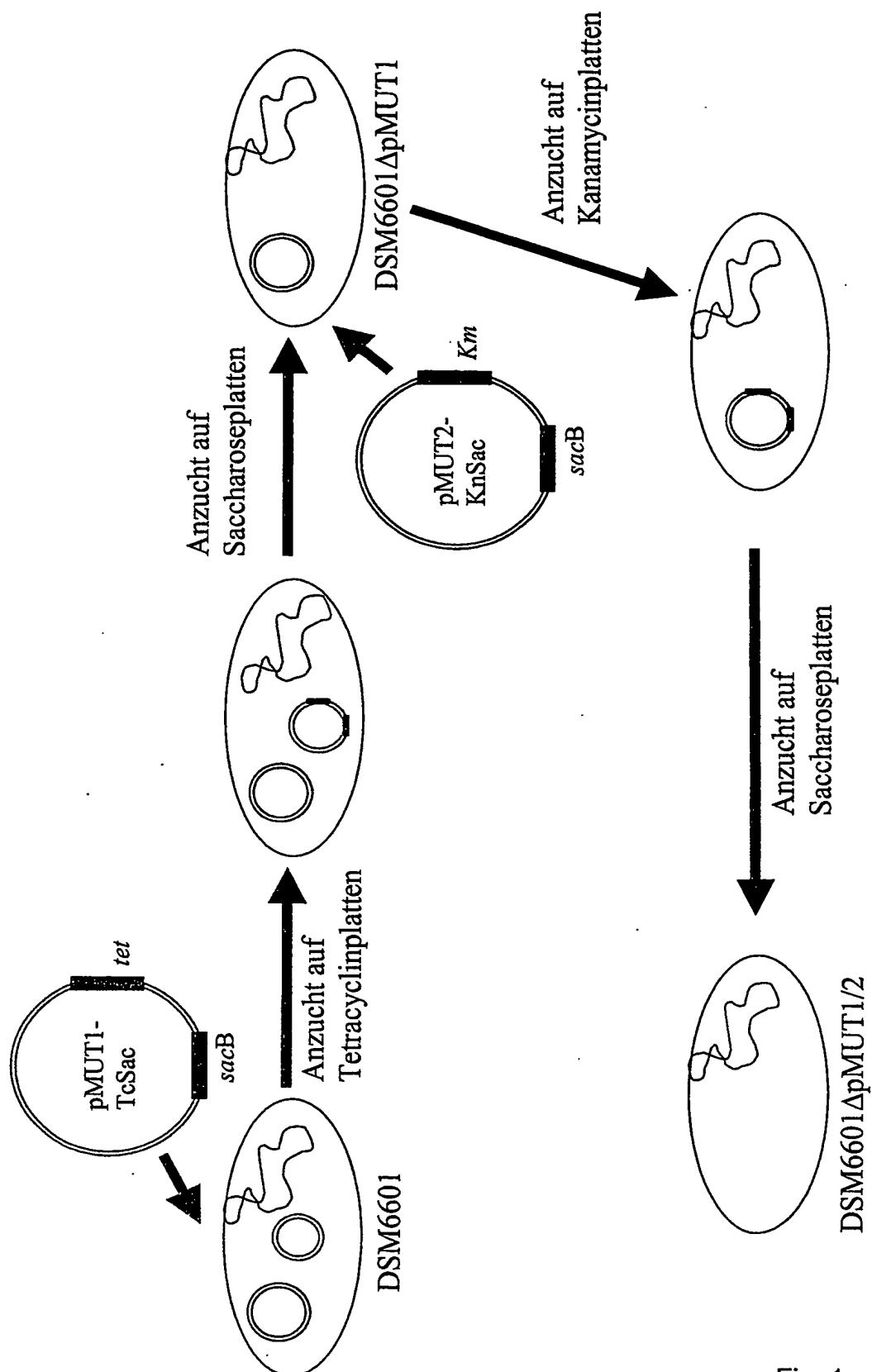


Fig. 1

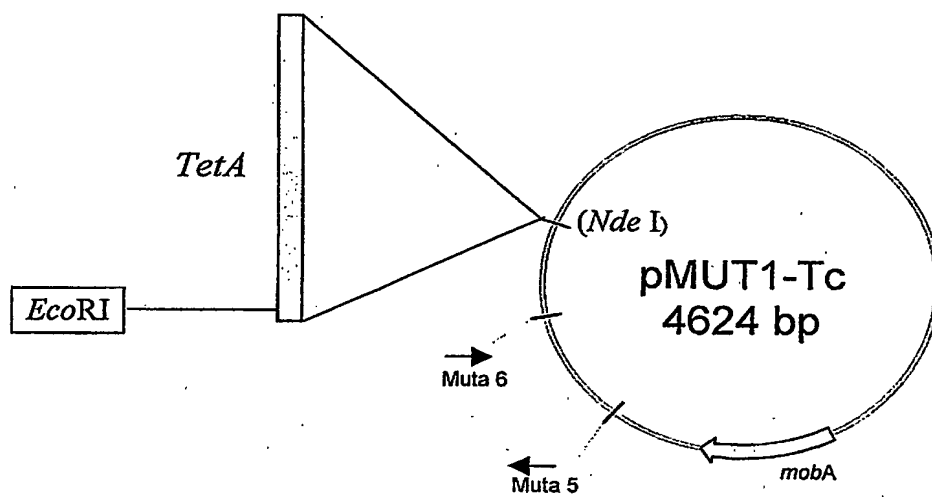


Fig. 2

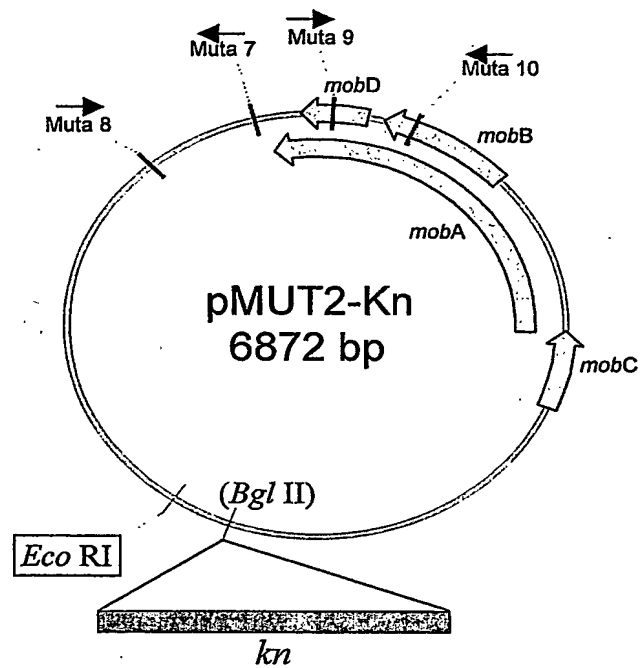


Fig. 3

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12R1/19 A61K35/74 C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12R A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/26642 A (PROPPERT HANS ; PHARMA ZENTRALE GMBH (DE)) 3 June 1999 (1999-06-03) the whole document	1-8
A	WO 98/44134 A (BLUM OEHLER GABRIELLE ; SONNENBORN ULRICH (DE); PROPPERT HANS (DE); HA) 8 October 1998 (1998-10-08) the whole document	1-8
A	WO 00/78925 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 28 December 2000 (2000-12-28) page 3, line 16 - page 5, line 19; examples 4-9	1-8
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 2004

Date of mailing of the international search report

04/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mossier, B

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 686 184 A (PUEHLER ALFRED ET AL) 11 August 1987 (1987-08-11) abstract column 6, line 31 - line 47; example 4	1-8
A	BLUM ET AL: "Properties of Escherichia coli strains of serotype 06" PLASMID, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 4, 1 July 1995 (1995-07-01), pages 234-236, XP002085750 ISSN: 0147-619X the whole document	1-8
A	KRUIS W ET AL: "Einsatz von Probiotika in der Humanmedizin" DIE MEDIZINISCHE WELT, XX, XX, 1996, pages 53-57, XP002097855 ISSN: 0025-8512	
A	CUKROWSKA B ET AL: "Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917." SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. FEB 2002, vol. 55, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 204-209, XP002295421 ISSN: 0300-9475	
A	FIGUEIREDO P P ET AL: "Influence of oral inoculation with plasmid-free human Escherichia coli on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION. JUL 2001, vol. 33, no. 1, July 2001 (2001-07), pages 70-74, XP009036229 ISSN: 0277-2116	
A	DUVAL-IFLAH Y ET AL: "'Implantation of a strain of 'Escherichia coli' in the digestive tract of human new-borns: barrier effect against antibioresistant 'E. coli' (author's transl)!" ANNALES DE MICROBIOLOGIE. 1982 MAY-JUN, vol. 133, no. 3, May 1982 (1982-05), pages 393-408, XP009036261 ISSN: 0300-5410	
	----- -/--	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOLKER-NIELSEN T ET AL: "A statistical analysis of the formation of plasmid-free cells in populations of Escherichia coli." JOURNAL OF BACTERIOLOGY. JUL 1994, vol. 176, no. 14, July 1994 (1994-07), pages 4306-4310, XP009009847 ISSN: 0021-9193 -----	

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9926642	A	03-06-1999	DE 19751907 A1	29-07-1999
			AT 206617 T	15-10-2001
			CZ 20001894 A3	15-11-2000
			DE 59801718 D1	15-11-2001
			DK 1033993 T3	28-01-2002
			EE 200000270 A	15-08-2001
			WO 9926642 A1	03-06-1999
			EP 1033993 A1	13-09-2000
			ES 2165709 T3	16-03-2002
			HK 1031996 A1	28-03-2002
			HU 0004366 A2	28-04-2001
			JP 2001523726 T	27-11-2001
			NO 20002577 A	18-07-2000
			PL 340328 A1	29-01-2001
			PT 1033993 T	28-03-2002
WO 9844134	A	08-10-1998	DE 19713543 A1	08-10-1998
			AU 739941 B2	25-10-2001
			AU 7209598 A	22-10-1998
			BR 9808458 A	02-05-2000
			CA 2285633 A1	08-10-1998
			CN 1253590 T	17-05-2000
			EA 3700 B1	28-08-2003
			EA 3738 B1	28-08-2003
			EE 9900445 A	17-04-2000
			WO 9844134 A2	08-10-1998
			EP 0975774 A2	02-02-2000
			HU 0001857 A2	28-10-2000
			JP 2000514661 T	07-11-2000
			JP 2003000245 A	07-01-2003
			NZ 338000 A	28-09-2001
			PL 336156 A1	05-06-2000
			SK 133899 A3	16-05-2000
			TR 9902434 T2	21-01-2000
			TW 567225 B	21-12-2003
			US 6391631 B1	21-05-2002
			ZA 9802733 A	21-09-1998
WO 0078925	A	28-12-2000	AU 5623200 A	09-01-2001
			CA 2375482 A1	28-12-2000
			EP 1208190 A1	29-05-2002
			JP 2003503020 T	28-01-2003
			NZ 516737 A	31-10-2003
			WO 0078925 A1	28-12-2000
			US 6709852 B1	23-03-2004
			US 2004053413 A1	18-03-2004
US 4686184	A	11-08-1987	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12R1/19 A61K35/74 C12N1/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12R A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99/26642 A (PROPPERT HANS ; PHARMA ZENTRALE GMBH (DE)) 3. Juni 1999 (1999-06-03) das ganze Dokument	1-8
A	WO 98/44134 A (BLUM OEHLER GABRIELLE ; SONNENBORN ULRICH (DE); PROPPERT HANS (DE); HA) 8. Oktober 1998 (1998-10-08) das ganze Dokument	1-8
A	WO 00/78925 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 28. Dezember 2000 (2000-12-28) Seite 3, Zeile 16 - Seite 5, Zeile 19; Beispiele 4-9	1-8
	----- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. September 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/10/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mossier, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 686 184 A (PUEHLER ALFRED ET AL) 11. August 1987 (1987-08-11) Zusammenfassung Spalte 6, Zeile 31 - Zeile 47; Beispiel 4	1-8
A	BLUM ET AL: "Properties of Escherichia coli strains of serotype 06" PLASMID, NEW YORK, NY, US, Bd. 23, Nr. 4, 1. Juli 1995 (1995-07-01), Seiten 234-236, XP002085750 ISSN: 0147-619X das ganze Dokument	1-8
A	KRUIS W ET AL: "Einsatz von Probiotika in der Humanmedizin" DIE MEDIZINISCHE WELT, XX, XX, 1996, Seiten 53-57, XP002097855 ISSN: 0025-8512	
A	CUKROWSKA B ET AL: "Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917." SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. FEB 2002, Bd. 55, Nr. 2, Februar 2002 (2002-02), Seiten 204-209, XP002295421 ISSN: 0300-9475	
A	FIGUEIREDO P P ET AL: "Influence of oral inoculation with plasmid-free human Escherichia coli on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION. JUL 2001, Bd. 33, Nr. 1, Juli 2001 (2001-07), Seiten 70-74, XP009036229 ISSN: 0277-2116	
A	DUVAL-IFLAH Y ET AL: "'Implantation of a strain of 'Escherichia coli' in the digestive tract of human new-borns: barrier effect against antibioresistant 'E. coli' (author's transl)!" ANNALES DE MICROBIOLOGIE. 1982 MAY-JUN, Bd. 133, Nr. 3, Mai 1982 (1982-05), Seiten 393-408, XP009036261 ISSN: 0300-5410	
	----- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>TOLKER-NIELSEN T ET AL: "A statistical analysis of the formation of plasmid-free cells in populations of Escherichia coli." JOURNAL OF BACTERIOLOGY. JUL 1994, Bd. 176, Nr. 14, Juli 1994 (1994-07), Seiten 4306-4310, XP009009847 ISSN: 0021-9193</p> <p>-----</p>	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9926642	A	03-06-1999	DE 19751907 A1	29-07-1999
			AT 206617 T	15-10-2001
			CZ 20001894 A3	15-11-2000
			DE 59801718 D1	15-11-2001
			DK 1033993 T3	28-01-2002
			EE 200000270 A	15-08-2001
			WO 9926642 A1	03-06-1999
			EP 1033993 A1	13-09-2000
			ES 2165709 T3	16-03-2002
			HK 1031996 A1	28-03-2002
			HU 0004366 A2	28-04-2001
			JP 2001523726 T	27-11-2001
			NO 20002577 A	18-07-2000
			PL 340328 A1	29-01-2001
			PT 1033993 T	28-03-2002
WO 9844134	A	08-10-1998	DE 19713543 A1	08-10-1998
			AU 739941 B2	25-10-2001
			AU 7209598 A	22-10-1998
			BR 9808458 A	02-05-2000
			CA 2285633 A1	08-10-1998
			CN 1253590 T	17-05-2000
			EA 3700 B1	28-08-2003
			EA 3738 B1	28-08-2003
			EE 9900445 A	17-04-2000
			WO 9844134 A2	08-10-1998
			EP 0975774 A2	02-02-2000
			HU 0001857 A2	28-10-2000
			JP 2000514661 T	07-11-2000
			JP 2003000245 A	07-01-2003
			NZ 338000 A	28-09-2001
			PL 336156 A1	05-06-2000
			SK 133899 A3	16-05-2000
			TR 9902434 T2	21-01-2000
			TW 567225 B	21-12-2003
			US 6391631 B1	21-05-2002
			ZA 9802733 A	21-09-1998
WO 0078925	A	28-12-2000	AU 5623200 A	09-01-2001
			CA 2375482 A1	28-12-2000
			EP 1208190 A1	29-05-2002
			JP 2003503020 T	28-01-2003
			NZ 516737 A	31-10-2003
			WO 0078925 A1	28-12-2000
			US 6709852 B1	23-03-2004
			US 2004053413 A1	18-03-2004
US 4686184	A	11-08-1987	KEINE	